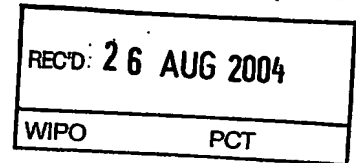


05. 7. 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2003年 6月13日

出 願 番 号
Application Number: 特願2003-169370
[ST. 10/C]: [JP2003-169370]

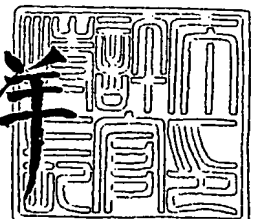
出 願 人
Applicant(s): 第一サントリーファーマ株式会社

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 8月12日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川 洋



【書類名】 特許願

【整理番号】 031317

【提出日】 平成15年 6月13日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市左京区下鴨南芝町 4

 【氏名】 堀 利行

【特許出願人】

 【識別番号】 503062312

 【氏名又は名称】 第一サントリーファーマ株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089705

 【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 社本 一夫

 【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

 【識別番号】 100076691

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 増井 忠弐

【選任した代理人】

 【識別番号】 100075270

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100080137

【弁理士】

【氏名又は名称】 千葉 昭男

【選任した代理人】

【識別番号】 100096013

【弁理士】

【氏名又は名称】 富田 博行

【選任した代理人】

【識別番号】 100091638

【弁理士】

【氏名又は名称】 江尻 ひろ子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書**【発明の名称】** Th1型免疫疾患予防又は治療用医薬組成物**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼAに作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質を有効成分とするTh1型免疫疾患の予防又は治療用医薬組成物。

【請求項2】 ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼAに作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質を有効成分とする、Th1型免疫疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応、線維化又は臓器機能障害の予防又は治療用医薬組成物。

【請求項3】 ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼAに作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質がナトリウム利尿ペプチドである請求項1又は2記載の医薬組成物。

【請求項4】 ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド又は脳性ナトリウム利尿ペプチドである請求項3に記載の医薬組成物。

【請求項5】 心房性ナトリウム利尿ペプチドがヒト由来である請求項4に記載の医薬組成物。

【請求項6】 ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼAに作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質を投与することを特徴とするTh1型免疫疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、樹状細胞に発現するナトリウム利尿ペプチド（NP）受容体であるグアニリル・サイクラーゼA（GC-A）に作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート（cGMP）産生を亢進し得る物質を有効成分とするTh1型免疫疾患の予防又は治療に供する医薬組成物に関するものである。

【0002】**【従来の技術】**

免疫系は本来、外来の異物（微生物等）を認識し排除するための防御機構として進化してきた。そのためには、生体は自己の細胞や組織と外来の異物（非自己）を区別し、自己に対しては反応しないか、反応しても機能を発揮できない状態（免疫寛容）を保持しつつ、非自己を速やかにかつ効率的に排除すべく獲得免疫を発達させてきた。その中心的な役割を担っているのはT細胞である。未分化な末梢ナイーブT細胞（Thp）は、抗原刺激により増殖、分化を開始する。その際、Thpは表面上のT細胞レセプターを介して、マクロファージや樹状細胞等の抗原提示細胞から抗原の提示を受けると同時に活性化関連分子群からのシグナルにより活性化され、IL-2を分泌して増殖する。その後、殆ど全てのサイトカインを産生しうるTh0に分化し、抗原刺激の種類や強さ、抗原提示細胞による刺激シグナル等により最終的な分化の方向が決定され、Th1又はTh2へと成熟して機能が分かれ、それぞれ特異的なサイトカインの産生、さらなる細胞増殖、細胞傷害活性などが誘導される。即ち、インターロイキン-12（IL-12）は細胞性免疫に関与するTh1細胞への分化を誘導し、分化したTh1細胞はインターロイキン-2（IL-2）やインターフェロン- γ （IFN- γ ）等のサイトカインを産生し、一方、インターロイキン-4（IL-4）は体液性免疫に関与するTh2細胞への分化を誘導し、インターロイキン-4、10（IL-4、10）等のサイトカインを産生する。両細胞が産生したサイトカインは、Th1又はTh2細胞への分化や両細胞が産生するサイトカインの働きを互いに負に制御し、Th1/Th2バランスの均衡が保たれている。

【0003】

近年、これらTh1/Th2バランスの不均衡が免疫病発症の原因になると考えられている。Th1を中心とした免疫応答（Th1型免疫）に偏った場合、細胞性免疫が増強され癌や感染症に対する免疫反応は亢進されるが、自己の組織傷害が引き起こされ自己免疫疾患発症の原因となる。組織の損傷や感染は引き続き炎症反応、更に組織の線維化、臓器の機能障害をもたらす。

【0004】

また、正常な免疫応答でも臓器移植に伴う拒絶反応や骨髄（造血幹細胞）移植に伴う移植片対宿主病を抑制することが治療上待望されている。これらで誘導さ

れる免疫応答は基本的に同一で、T h 1 型免疫が主体をなしている。

【0005】

T h 1 型免疫に起因する免疫異常により発症する T h 1 型免疫疾患としては、例えば移植に対する拒絶反応、骨髄（造血幹細胞）移植による移植片対宿主病、及び自己免疫性肝炎、慢性関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、潰瘍性大腸炎、クローン病、多発性硬化症、自己免疫性心筋炎、乾癬、強皮症、重症筋無力症、多発性筋炎・皮膚筋炎、橋本病、自己免疫血球減少症（赤芽球癆、再生不良性貧血等）、シェーグレン症候群、血管炎症候群、全身性エリテマトーデスなどを含む自己免疫疾患、更にこれらの疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応、線維化、臓器機能障害等が挙げられる。

【0006】

T h 1 型免疫に起因する自己免疫疾患や移植免疫、更にそれらに伴う慢性活動性の免疫学的な炎症反応に対する治療には T h 1 型免疫の選択的な抑制が望まれている。このような状況下において、現在、T 細胞活性化機構のメディエーターの制御による治療が期待されており、シクロスポリンや F K 5 0 6 による T 細胞に対する強力な免疫抑制効果、抗サイトカイン療法、抗接着分子（活性化関連分子）療法、モノクローナル抗体療法等が注目されている。

【0007】

しかし、これらの療法も、従来からのステロイド剤、核酸合成系に作用するある種の免疫抑制剤又はインターフェロン製剤による療法と同様に、T h 1 型免疫選択的とはいえず、感染症増悪、糖尿病、血栓、満月様顔貌、腎症、発熱など種々の副作用等の問題が解決されている訳ではなく、より安全性、有効性に優れた薬剤の開発が望まれている。

【0008】

自己免疫疾患は全身性に加えて、ほとんどの臓器においても認められる疾患である。また今後、臓器移植手術や造血幹細胞移植がますます発展するのに伴い、拒絶反応や移植片対宿主病の問題も増大してくる。このように、T h 1 型免疫が中心的な役割を担っている疾患は多岐に渡るものであり、有効な治療薬の開発が期待されている。実際、T h 1 型免疫抑制作用を有する薬剤としては、serotoni

n 1A receptor antagonist(J Immunol 153:489-498,1994)、pentoxifyllin(J Cardiovasc Pharmacol 25 Suppl 2:S75-79,1995)、beta2-adrenergic receptor agonist (J Immunol 158:4200-4210,1997、J Clin Invest 100:1513-1519,1997)、アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるiloprost(J Autoimmun 10:519-529,1997)、P38 MAPキナーゼ阻害剤であるpyridinyl imidazole 化合物やSB203580(EMBO J 17:2817-2829,1998、Int Immunol 12:253-261,2000)、lisofylline(J Immunol 163:6567-6574,1999)、adenosine A2a receptor agonistであるCGS-21680(J Immunol 164:436-442,2000)、NO-aspirin(Gastroenterology 118:404-421,2000)及び1,25-dihydroxyvitamin D(3)(Eur J Immunol 30:498-508,2000)等が報告されている。しかし、Th 1 型免疫を選択的に抑制し、副作用が軽減できるような臨床使用可能な医薬品は開発されていない。

【0009】

樹状細胞はリンパ器官T領域においてナイーブT細胞を最も強力に活性化できる唯一の抗原提示細胞であり、生体防御の恒常性の維持において重要な役割を担うことが知られている(Banchereau, J. et al. Nature, Vol. 392, p245, 1998)。樹状細胞は通常組織でT細胞の活性化能の低い未熟な状態で存在するが、病原体や損傷した組織から放出される炎症性メディエーターにより成熟・活性化刺激を受けると、抗原由来のペプチドをMHC複合体に結合させてナイーブT細胞へ提示する。同時に共刺激分子の発現を増強させ、種々のサイトカインを産生させ、T細胞を呼び寄せ、抗原特異的な細胞を活性化して免疫応答を誘導する(伊豫田智典, 稲葉カヨ, 蛋白質 核酸 酵素, Vol. 47, p2133, 2002)。また、ヒト樹状細胞には少なくとも2種の前駆細胞が存在する。単球系前駆細胞はGM-CSFとIL-4の刺激で分化し、更に、CD40Lの刺激により産生したIL-12により、ナイーブT細胞をTh 1細胞に分化させる。形質細胞系前駆細胞はウイルスやCpGオリゴヌクレオチド、更にはIL-3とCD40Lの刺激によりIL-12を殆ど産生しない樹状細胞に分化し、ナイーブT細胞をTh 2細胞に分化させる(樗木俊聡、医学のあゆみ、Vol.205,p57,2003)。即ち、樹状細胞は免疫系におけるTh 1/Th 2バランス制御の重要な役割を担う細胞である。従って、樹状細胞に特異的に作用し、その活性又はサイトカイン発現を調節して

、ナイーブT細胞のTh1細胞への分化増殖を抑制し、Th2型に偏向させうる薬剤を開発できれば、Th1型免疫に起因する免疫異常に対してより根源的な治療又は予防薬となりうると期待できる。しかし現在までにそのような作用を持つ有力な薬剤は存在しない。

【0010】

一方、GC-Aに作用して、セカンドメッセンジャーであるcGMP産生を亢進し得る物質としてペプチド性物質、特にナトリウム利尿ペプチドが挙げられるが、当該ペプチドにはANP（心房性ナトリウム利尿ペプチド）、BNP（脳性ナトリウム利尿ペプチド）及びCNP（C型ナトリウム利尿ペプチド）の3種類があり、当該ペプチドに対するNP受容体としては、GC-A、GC-B（グアニリル・サイクラーゼB）及びNPR-C（NP受容体-C）の3種類がある。GC-A及びGC-Bは膜結合型グアニリル・サイクラーゼ構造をとること、ANP及びBNPはGC-Aの特異的リガンドであること、CNPはGC-Bの特異的リガンドであること、並びにこれらは各々の受容体結合後、細胞内のcGMPを上昇させることにより利尿作用及び血管拡張作用等の生理作用を発現することが判明している。また、NPR-CはcGMP産生と共役せず、これらのホルモンの代謝、クリアランスに関与すると言われている（Suzuki, T. et al. Cardiovasc. Res. Vol.51, p489, 2001）。

ANPは心臓より分泌され、水電解質代謝及び血圧の調節に重要な役割を果たすペプチドホルモンである。ヒト及びモデル動物において、心肥大及び心不全の重症度に伴い、血中ANP濃度が上昇することが知られており、心不全の病態に代償的に作用すると考えられている。実際に心不全患者においてANP投与により血管拡張作用及び利尿作用が発現し、心臓の前負荷、後負荷が軽減され、血行動態改善効果が認められている（Suzuki, T. et al. Cardiovasc. Res. Vol.51, p489, 2001）。

【0011】

ANPの受容体であるGC-Aは心血管系のみならず、白血球にも発現し、ANPが血球系細胞に対して生理機能を担う可能性が示唆されている。即ち、ANPが好中球の遊走を促進すること（Izumi, T. et al. J. Clin. Invest. Vol. 1

08, p203, 2001)、ラット胸腺細胞の増殖を抑制すること (Vollmar, A. M., K. N., et al. Endocrinology. Vol. 137, 1706, 1996)、ヒトNatural Killer (NK) 細胞の細胞障害性を増強すること (Moss, R. B., and M. G. Golightly, Peptides, Vol. 2, p851, 1991)、マウスマクロファージからのNOやTNF α 産生を抑制すること (Kiemer, A. K., and A. M. Vollmar. J. Biol. Chem. Vol. 273, p13444, 1998) 等が報告されている。

【0012】

しかしながら、マウス単球由来マクロファージへの作用の場合と異なり、ヒト単球にはANPの受容体が発現せず、ANPは単球でcGMP産生などの生理活性を発現しないことが報告されており (Sprenger H., et al., Immunobiol. Vol. 183, p94, 1991)、免疫系に関与するヒト単球由来の樹状細胞におけるGC-Aに作用してcGMP産生を亢進し得る物質の生理機能や病態生理的意義、若しくは免疫調節作用については全く報告がなかった。

【0013】

【発明が解決しようとする課題】

従って、本発明は、上記した現状に鑑み、Th1型免疫疾患である、自己免疫疾患、臓器移植の拒絶反応、骨髄（造血幹細胞）移植による移植片対宿主病、及び自己免疫疾患や類縁疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応、更に組織の線維化及び臓器機能障害に対して、Th1型サイトカイン産生抑制、Th1細胞の増殖・機能抑制を機序とする副作用のない、臨床的に適応し得る、Th1型免疫選択的抑制剤を提供することを課題とする。更に詳しくは、樹状細胞に発現するNP受容体であるGC-Aに作用してcGMP産生を亢進し、樹状細胞のサイトカイン産生を調節しT細胞をTh2に分化し得る物質を有効成分とするTh1型免疫疾患の予防又は治療に供する医薬組成物を提供することである。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明に係る医薬組成物の有効成分として用い得る物質は、NP受容体であるGC-Aを介してcGMP産生を亢進し得る特性を有する物質であればよく、ペ

プチド性物質が好ましいが、特に特定されるものではないため、ペプチド性物質以外でもNP受容体であるGC-Aに作用してcGMPを亢進し得る化合物を用いることができる。

【0015】

ペプチド性物質としては、ナトリウム利尿ペプチドが好ましく、例えば心房性ナトリウム利尿ペプチド（以下、ANP）、脳性ナトリウム利尿ペプチド（以下、BNP）等が挙げられる。

【0016】

ANPとしては28個のアミノ酸よりなるヒト由来 α -hANP（配列番号：1）やラット由来 α -rANP（配列番号：2）を用いることができるが、本発明に係る有効成分のペプチドとしては、ANPのリング構造（Cysに基づくジスルフィド結合の形成）及びリング構造に続くC末端部を有するペプチドであればよい。当該ペプチドとしては α -hANPの7-28位のアミノ酸残基を有するペプチド（配列番号：3）が挙げられる。ANPとしては特にヒト由来の α -hANPが望ましい。

【0017】

BNPとしては32個のアミノ酸よりなるヒトBNP（配列番号：4）等が挙げられる。

【0018】

更に、本発明に係るNP受容体であるGC-Aを介してcGMP産生を亢進し得る特性を有する物質としては、天然から純粋に単離、精製されたもの、又は化学合成法若しくは遺伝子組換え法により製造されたものであってもよく、例えば上記物質（ α -hANP等）に係るアミノ酸配列に基づき、当業者であれば適宜公知の方法により、当該配列中のアミノ酸残基を欠失、置換、付加、挿入等の修飾を施すことにより得ることができ、何れかの方法により得られた物質がNP受容体であるGC-Aに作用してcGMP産生を亢進し得る物質であれば何れも用いることができる。当該物質としては、前記の他に、カエルANP（配列番号：5）、ブタBNP（配列番号：6）、ラットBNP（配列番号：7）、ニワトリNP（配列番号：8）等が挙げられる。

【0019】

本発明に係る医薬組成物の有効成分として用い得る物質は、無機酸、例えば塩酸、硫酸、リン酸、又は有機酸、例えばギ酸、酢酸、酪酸、コハク酸、クエン酸等の酸付加塩として用いることができる。ナトリウム、カリウム、リチウム、カルシウム等の金属塩、有機塩基による塩の形態であってもよい。また、本発明に係る医薬組成物は、その有効成分に係る物質の遊離形としても、又はその医薬的に許容し得る塩であってもよい。

【0020】

本発明に係る医薬組成物の有効成分として用い得る物質又はその薬理学的に許容し得る塩は、公知の薬理学的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤などと混合して医薬に一般に使用されている投与方法、即ち経口投与方法、又は静脈内投与、筋肉内投与若しくは皮下投与等の非経口投与方法によって投与するのが好ましい。

【0021】

有効成分がペプチド性物質の場合、消化管内で分解を受けにくい製剤、例えば活性成分であるペプチドをリボゾーム中に包容したマイクロカプセル剤として経口投与することも可能である。また、直腸、鼻内、舌下などの消化管以外の粘膜から吸収せしめる投与方法も可能である。この場合は坐剤、点鼻スプレー、舌下錠といった形態で投与することができる。

【0022】

本発明に係る医薬組成物の有効成分として用い得る物質の投与量は、疾患の種類、患者の年齢、体重、症状の程度及び投与経路などによっても異なるが、一般的に $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲で投与することができ、 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 5 \text{mg}/\text{kg}$ で投与するのが好ましい。

【0023】

本発明により、ナトリウム利尿ペプチド受容体である GC-A に作用して cGMP 産生を亢進し得る物質を有効成分とする組成物が、樹状細胞に特異的に作用してそのサイトカイン産生を調節し、ナイーブ T 細胞の Th2 偏向性を誘導することにより Th1 型免疫反応を抑制するため、Th1 型免疫疾患に有効であるこ

とが明らかとなった。特に、有効成分としてANPを用いた場合、ANP単独では樹状細胞からのサイトカイン産生やT細胞の増殖反応に影響せず、LPS（リポ多糖）刺激時の反応のみを調節する作用を示したことは、正常時の免疫機能には大きな影響を及ぼすことなく、刺激時の過剰反応のみを抑制すること、即ち、副作用が小さく、安全に使用できることを示し、有用である。

【0024】

尚、LPSはグラム陰性菌の外膜の主要構成成分であり、病原体固有の構成成分の認識に極めて重要であって樹状細胞に発現するToll様受容体（TLR）ファミリーと呼ばれる膜タンパク受容体群のうちTLR4により認識され、樹状細胞を成熟、活性化させて刺激し、サイトカイン及びCD40等の補助機能分子の発現を誘導する物質である。

【0025】

本発明により、ヒト由来の樹状細胞及びナイーブT細胞を用いた一連の実験から、ヒト樹状細胞におけるGC-Aの発現、NP受容体であるGC-Aに作用してcGMP産生を亢進し得る物質の樹状細胞におけるサイトカイン産生調節作用及びT細胞に対するTh2偏向性作用が明らかにされたことは、臨床上有用である。

【0026】

これらのことから、NP受容体であるGC-Aに作用してcGMP産生を亢進し得る物質が樹状細胞に発現するGC-Aに作用して、ナイーブT細胞をTh2型に偏向させる作用が示され、免疫系におけるT細胞に係るTh1/Th2バランスを調節し得ることから、当該物質を投与してTh1型免疫疾患を改善し得ること、及びTh1型免疫疾患以前の状態においてもTh1及びTh2の割合を常法により測定し、Th1の割合が高い場合は当該物質を投与して免疫系におけるTh1/Th2バランスを調節することによりTh1型免疫疾患の発症を予防し得る。

【0027】

以上のことから、本発明は以下の事項を含む。

(1) ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼAに作用

してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質を有効成分とする T h 1 型免疫疾患の予防又は治療用医薬組成物。

(2) T h 1 型免疫疾患が、移植に伴う拒絶反応に起因する疾患、骨髓（造血幹細胞）移植による移植片対宿主病、自己免疫疾患である上記（1）記載の医薬組成物。

(3) 自己免疫疾患が、自己免疫性肝炎、慢性関節リウマチ、インスリン依存性糖尿病、潰瘍性大腸炎、クローン病、多発性硬化症、自己免疫性心筋炎、乾癬、強皮症、重症筋無力症、多発性筋炎・皮膚筋炎、橋本病、自己免疫血球減少症（赤芽球癆、再生不良性貧血等）、シェーグレン症候群、血管炎症候群、全身性エリテマトーデス等である上記（2）記載の医薬組成物。

(4) ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼ A に作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質を有効成分とする、T h 1 型免疫疾患に起因する組織の損傷や感染に伴って起こる炎症反応、線維化又は臓器機能障害の予防又は治療用医薬組成物。

(5) ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼ A に作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質を投与することを特徴とする T h 1 型免疫疾患の治療方法。

(6) ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼ A に作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質がナトリウム利尿ペプチドである上記（1）～（5）記載の医薬組成物又は治療方法。

(7) ナトリウム利尿ペプチドが心房性ナトリウム利尿ペプチド又は脳性ナトリウム利尿ペプチドである上記（6）記載の医薬組成物又は治療方法。

(8) 心房性ナトリウム利尿ペプチドがヒト由来である上記（7）記載の医薬組成物又は治療方法。

(9) ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼ A に作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質を樹状細胞に作用させて、T 細胞に対する T h 2 偏向性を誘導することを特長とする免疫系における T h 1 / T h 2 バランスを調節する方法。

【0028】

【発明の実施の形態】

本発明者は、ヒト末梢血より単離、培養した樹状細胞における ANP 受容体 (GC-A) 発現と、ANP の cGMP 産生亢進活性を検討し、また、樹状細胞における ANP の生理機能を明らかにするために、樹状細胞の分化、リンパ球増殖作用、サイトカイン発現、Th1/Th2 偏向性に対する作用を検討した結果、GC-A に作用して cGMP 産生を亢進し得る物質が Th1 型免疫疾患の予防又は治療に有用であることを見出した。

A. ヒト樹状細胞の単離、及び、NP 受容体発現、cGMP 産生亢進作用の実験方法**1. ヒト末梢血由来樹状細胞の単離と培養**

実験には健常人ボランティアより得た末梢血 (京都府赤十字センターより供与) の白血球層 (buffy coats) を用いた。末梢血単球画分を Fico 11-Paque による密度勾配遠心により分離した後、MACS CD14 を用いた磁気ビーズカラムにより、又は細胞培養用フラスコにて 37℃ で 1 時間培養して接着細胞を選抜することにより単球を分離した。未成熟樹状細胞は、 2×10^5 cells/ml の単球を 10% ウシ胎児血清、50 ng/ml ヒト GM-CSF、20 ng/ml ヒト IL-4 存在下、7 日間 37℃ で培養することにより得た。

【0029】**2. NP 受容体の RT-PCR**

RNA 単離用キットを用いて単球及び樹状細胞よりトータル RNA を抽出した後、1 µg のトータル RNA と oligo (dT) primer を用いてトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素により 1 本鎖 cDNA を合成した。Primer として以下を使用した。

【0030】

【化1】

mRNA		Primer Sequence	Seq.No.	PCR product	
				Annealing temp. (bp)	(°C)
GC-A	Sense	5'-GGGAACCTCAAGTCATCCAAC-3'	9	1163	55
	Antisense	5'-ATGAAGGGCAAAGGCAAGGT-3'	10		
GC-B	Sense	5'-TCTAGAAAATGACAGCATCA-3'	11	890	49
	Antisense	5'-TGACAACCTTGATGTCTACA-3'	12		
NPR-C	Sense	5'-GAAGGTATCGCCGGGCAGGTGTCC-3'	13	401	66
	Antisense	5'-TCTTCCCGTAATCCCGATGTTTT-3'	14		
β -actin	Sense	5'-TCCTGTGGCATCCACGAACT-3'	15	314	60
	Antisense	5'-GAAGCATTGCGGTGGACGAT-3'	16		

【0031】

PCRはNP受容体については35サイクル、 β -actinについて25サイクル実施した。PCR産物は1.5~2%のアガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで染色した後、UV透視装置で検出した。

【0032】

3. cGMP産生亢進活性の測定

1×10^5 cells/sampleの細胞を500 μ Lの培養液、10 mM HEPES、0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine、1 μ M phospholamidon存在下で37℃にて10分間インキュベーションした後、ANP又はCNPを最終濃度 10^{-12} ~ 10^{-6} Mになるように添加し、更に15分間インキュベーションした。細胞を洗浄、破壊後、細胞内cGMP濃度をELISA法で測定した。

B. 樹状細胞によるナイーブT細胞増殖反応、サイトカイン産生、ナイーブT細胞分化の実験方法

1. 活性化樹状細胞によるT細胞の増殖反応

ナイーブT細胞（ナイーブCD4⁺T細胞）は、新生児臍帯血由来の単球画分より、MACS CD4⁺T細胞単離用磁気ビーズを用いて単離した。樹状細胞

を ANP (10^{-7}M) の存在下又は非存在下でリポ多糖 (LPS、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$) と 24 時間培養し、活性化した。細胞を洗浄、放射線照射 (30Gy) して増殖能を失わせた後、ナイーブ T 細胞 ($1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{well}$) と共に 6 日間培養した。 $0.5\mu\text{Ci}/\text{well}$ の [methyl- ^3H]-thymidine を 8 時間取り込ませることにより、T 細胞の増殖能を評価した。

【0033】

2. 樹状細胞からのサイトカイン産生の測定

樹状細胞を、ANP ($10^{-8}\text{M} \sim 10^{-6}\text{M}$) 若しくは CNP (10^{-6}M) の存在下又は非存在下で LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) と 24 時間インキュベーションし、培養液中の IL-12、IL-10、TNF α 量を ELISA 法で測定した。

【0034】

3. ナイーブ T 細胞の細胞内サイトカイン発現解析 (樹状細胞の Th1/Th2 偏向性の検討)

樹状細胞は予め ANP (10^{-7}M) の存在下又は非存在下で LPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$) と 24 時間インキュベーションして活性化した後、放射線照射 (30Gy) により増殖能を失わせた。この樹状細胞 ($1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{well}$) と、臍帯血より分離したナイーブ T 細胞 ($1 \times 10^6 \text{ cells}/\text{well}$) を 6 日間共培養した。IL-2 ($50\text{U}/\text{mL}$) 存在下で T 細胞を更に 8 日間増殖させた後、T 細胞を回収し、 $50\text{ng}/\text{mL}$ のホルボールエステル (PMA) と $500\text{ng}/\text{mL}$ のイオノマイシンで 4 時間刺激した。インキュベーション終了 2 時間前に Brefeldin A ($10\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した。細胞を 2% ホルマリンで固定した後に、2% FBS、0.5% サポニンを含む溶媒で細胞膜を障害し、細胞内サイトカインを FITC 標識した抗 IFN- γ モノクローナル抗体及び、PE 標識した抗 IL-4 モノクローナル抗体で染色し、フローサイトメトリー法で解析した。IFN- γ 陽性細胞を Th1 型細胞、IL-4 陽性細胞を Th2 型細胞とみなした。

【0035】

【実施例】

以下に、本発明を実施例により更に具体的に説明する。

【0036】

実施例1 未成熟樹状細胞でのGC-A遺伝子の発現及びANPによるcGMP産生亢進活性

本発明者らはまず3種のNP受容体遺伝子が樹状細胞、単球に発現するかについて検討した。健康人末梢血より得た単球、及び未成熟樹状細胞よりRNAを調製し、RT-PCR法でNP受容体であるGC-A、GC-B、NPR-Cの遺伝子の発現を検討した。結果を図1に示す。

【0037】

陽性対照とした胎盤由来RNAでは3種類全てのNP受容体遺伝子の発現が認められた。単球では何れの受容体遺伝子の発現も見られなかったのに対し、未成熟樹状細胞ではGC-A遺伝子の発現のみが明確に認められた。このことから、単球にはNP受容体遺伝子は発現しないが、単球由来の樹状細胞ではGC-A遺伝子が特異的に発現することが確認された。

【0038】

次に、樹状細胞に発現するGC-Aが生理機能と共役するかを明らかにするために、単球、樹状細胞それぞれにおけるANPのcGMP産生亢進活性を検討した。対照として、GC-Bの特異的リガンドであるCNPを用いた。結果を図2に示す。

【0039】

ANPは 10^{-12} Mという低濃度より濃度依存的に樹状細胞内のcGMPを上昇させたが、単球では何れの濃度でもcGMPをほとんど上昇させなかった。また、CNPは単球、樹状細胞の何れにおいても細胞内cGMP濃度に影響しなかった。この結果は、図1に示したGC-A遺伝子発現の結果を裏付けるものであり、樹状細胞特異的にGC-Aが発現し、かつ、本受容体がANPに反応して、生理活性を担う可能性を強く示唆するものである。

【0040】

実施例2 ANPの樹状細胞サイトカイン発現に対する作用、及びTh2偏向性に関する検討

実施例1の結果から、ANPが樹状細胞に作用し、免疫反応を調節しうること

が判明した。

【0041】

樹状細胞の重要な機能は、ナイーブT細胞に抗原特異的な免疫反応を惹起することである。そこでまず、樹状細胞を成熟・活性化させることが知られているLPSの存在下又は非存在下で、ANPを樹状細胞に添加して、ナイーブT細胞の活性化・増殖反応に及ぼす影響を検討した。結果を図3に示す。

【0042】

ANPは単独ではナイーブT細胞の増殖反応に影響しなかったが、LPSを樹状細胞に添加すると、著明なT細胞の増殖反応を惹起した。

【0043】

一方、ANPをLPSと同時に添加すると、LPS処理した樹状細胞で誘導されたT細胞の増殖反応が、ほぼ完全に抑制されることが判明した。

【0044】

従って、ANPはLPSによる樹状細胞の活性化シグナル又は樹状細胞の機能に影響しうることが示された。

【0045】

樹状細胞が産生するサイトカインは樹状細胞とT細胞の相互作用発現に非常に重要な作用を果たすことが知られている。そこで次に、樹状細胞からのサイトカイン発現に対するANPの効果を検討した。結果を図4に示す。

【0046】

LPSは樹状細胞からのIL-12、TNF- α 、IL-10の産生を亢進させたが、これに対してANPは濃度依存的にIL-12とTNF- α を低下させ、一方、IL-10の産生を増強させた。なお、LPS未刺激時には樹状細胞からのIL-12、TNF- α 、IL-10産生能は低く、ANPは単独ではこれらに影響しなかった。

【0047】

また、GC-BのリガンドであるCNPはサイトカイン発現に影響しなかったことから、LPS刺激時におけるANPの作用は樹状細胞に発現するGC-Aを介したものであることが確認された。

【0048】

樹状細胞から産生されるサイトカインの中でIL-12は代表的なTh1型サイトカインであり、一方でIL-10はTh1細胞、活性化した単球及びNK細胞によって産生されるIL-12を始めとするサイトカインの活性をブロックすることが知られている。ANPがLPSで誘導された樹状細胞からのIL-12産生を抑制するが、IL-10産生を増強したことから、ANPは樹状細胞をTh2偏向性に誘導する可能性が示された。

【0049】

そこで、ANPが樹状細胞のTh2偏向性を誘導しうるかについて、樹状細胞をLPSで刺激時にANPを共存させ、ナイーブT細胞がTh1、Th2何れのタイプに分化、増殖するかを解析した。LPSは樹状細胞のToll-like receptor 4に作用し、IL-12発現を亢進させ、ナイーブT細胞を高いIL-12産生能を持ったTh1型細胞に偏向させることが知られている (Akira S, et al. Nat. Immunol. Vol.2, p675, 2001)。

【0050】

LPS単独、又はLPS及びANPの共存下で刺激した樹状細胞と、ナイーブT細胞を相互作用させた後に、T細胞をIL-2を含む培養液中で増殖させ、Th1型細胞が発現するサイトカインとしてIFN- γ 、Th2型細胞が発現するサイトカインとしてIL-4を、フローサイトメトリーを用いて解析した。図5に2例のT細胞標本の解析結果を示す。図5において、IFN- γ 陽性、IL-4陰性細胞はTh1型、IL-4陽性、IFN- γ 陰性細胞はTh2型のヘルパーT細胞に分化し、増殖したことを示す。

【0051】

Sample #1、Sample #2の何れにおいても、LPS単独処置群に比べ、ANP共処置群では、明らかにIL-4産生細胞が増加し、IFN- γ 産生細胞が減少することが示された。更に別の3標本についても検討し、同様の結果を得た。

【0052】

本実施例により、ANPが樹状細胞のIL-10産生を亢進させ、IL-12

産生を低下させることにより L P S の作用に拮抗し、樹状細胞を T h 2 偏向性に誘導して T 細胞を T h 2 型ヘルパー T 細胞に分化させることにより、T h 1 型免疫反応を抑制することを明らかにした。

【0053】

【発明の効果】

本発明により、ナトリウム利尿ペプチド受容体であるグアニリル・サイクラーゼ A に作用してサイクリックグアノシンモノフォスフェート産生を亢進し得る物質が、樹状細胞に作用して T h 2 偏向性を誘導し、T 細胞を T h 2 型細胞に分化させることにより T h 1 型免疫反応を抑制する作用を有することから、当該物質を有効成分とする医薬組成物が、免疫系における T h 1 / T h 2 バランスを調節することにより T h 1 型免疫疾患予防又は治療用医薬組成物として非常に有用である。

【0054】

【配列表】

<110> 第一サントリーファーマ株式会社

<120> T h 1 型免疫疾患予防又は治療用医薬組成物

<130> 031317

<160> 16

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly

5

10

15

Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

25

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Rat

<400> 2

Ser Leu Arg Arg Ser Ser Cys Phe Gly Gly Arg Ile Asp Arg Ile Gly

5

10

15

Ala Gln Ser Gly Leu Gly Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

25

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Cys Phe Gly Gly Arg Met Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser Gly Leu Gly

5

10

15

Cys Asn Ser Phe Arg Tyr

20

<210> 4

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp

5

10

15

Arg Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His

20

25

30

<210> 5

<211> 24

<212> PRT

<213> Frog

<400> 5

Ser Ser Asp Cys Phe Gly Ser Arg Ile Asp Arg Ile Gly Ala Gln Ser

5

10

15

Gly Met Gly Cys Gly Arg Arg Phe

20

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> Pig

<400> 6

Ser Pro Lys Thr Met Arg Asp Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Leu Asp

5

10

15

Arg Ile Gly Ser Leu Ser Gly Leu Gly Cys Asn Val Leu Arg Arg Tyr

20

25

30

<210> 7

<211> 45

<212> PRT

<213> Rat

<400> 7

Ser Gln Asp Ser Ala Phe Arg Ile Gln Glu Arg Leu Arg Asn Ser Lys

5

10

15

Met Ala His Ser Ser Ser Cys Phe Gly Gln Lys Ile Asp Arg Ile Gly

20

25

30

Ala Val Ser Arg Leu Gly Cys Asp Gly Leu Arg Leu Phe

35

40

45

<210> 8

<211> 29

<212> PRT

<213> Chick

<400> 8

Met Met Arg Asp Ser Gly Cys Phe Gly Arg Arg Ile Asp Arg Ile Gly

5

10

15

Ser Leu Ser Gly Met Gly Cys Asn Gly Ser Arg Lys Asn

20

25

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 9

gggaacctca agtcatccaa c

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 10

atgaagggtc aaggcaaggt

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 11

tctagaaaat gacagcatca

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 12

tgacaacttt gatgtctaca

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 13

gaaggtatcg ccgggcaggt gtcc

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 14

tcttcccgta attcccgatg tttt

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 15

tcctgtggca tccacgaaac t

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 16

gaagcatttg cggtggacga t

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は、ヒト単球 (monocytes) 及び未成熟樹状細胞 (immature DCs) における 3 種の NP 受容体、即ち GC-A、GC-B 及び NPR-C の mRNA 発現を RT-PCR 法で解析した図である。各受容体 mRNA の陽性対照として胎盤を用いた。また、RNA の純度、cDNA 合成の妥当性を β -actin cDNA の増幅により確認した。未成熟樹状細胞においてのみ GC-A mRNA が特異的に発現することを示す。

【図 2】

図 2 は、ヒト単球 (monocytes、黒四角印) 及び未成熟樹状細胞 (immature DCs、白四角印) における ANP (上図) 及び CNP (下図) の cGMP 産生亢進活性を示した図である。各値は 1×10^5 cells あたりの cGMP 量を示す。ANP は樹状細胞できわめて低濃度より cGMP 産生を亢進することを示す。

【図 3】

図3は、LPS刺激した樹状細胞による同種ナイーブT細胞の増殖反応に対するANPの効果を示す。樹状細胞はLPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$)、ANP (10^{-7}M)、LPS+ANP又はこれらの非存在下で24時間培養し、*irradiation*後、ナイーブT細胞と共に6日間培養した。このときのナイーブT細胞の細胞増殖能を $[^3\text{H}]\text{-thymidine}$ 取り込み能により評価した。白丸印:無処置, 黒丸印:ANP 10^{-7}M 処置, 白四角印:LPS $1\mu\text{g}/\text{mL}$ 処置, 黒四角印:ANP+LPS処置。各値は5例の平均値±標準誤差を示す。*は $p<0.05$ でその他の群との間に有意差があることを示す。有意差はStudentのt検定にて検定した。

【図4】

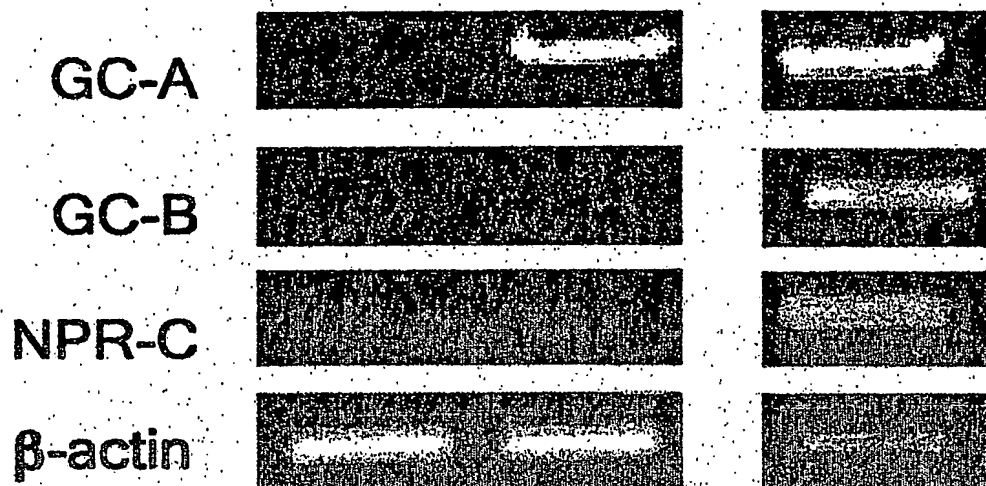
図4は、LPS刺激した樹状細胞からのサイトカイン産生に及ぼすANP及びCNPの影響を示す。 $1 \times 10^5 \text{ cells}/\text{tube}$ の樹状細胞をANP ($10^{-8}\sim 10^{-6}\text{M}$)若しくはCNP (10^{-6}M)の存在下又は非存在下でLPS ($1\mu\text{g}/\text{mL}$)と24時間インキュベーションした後の、メディウム中のIL-12、TNF- α 、IL-10免疫活性を示す。

【図5】

図5は、LPS又はLPS+ANPで前処置した樹状細胞とナイーブT細胞を共培養した後、更にIL-2含有培養液で増殖させたT細胞の細胞内IFN- γ 、IL-4産生をフローサイトメトリーで解析した結果を示す。図中の数字は、各分画における白血球の割合を百分率で示す。Sample #1、Sample #2は、それぞれ異なる提供者由来の樹状細胞を用いた結果を表す。

【書類名】 図面

【図 1】

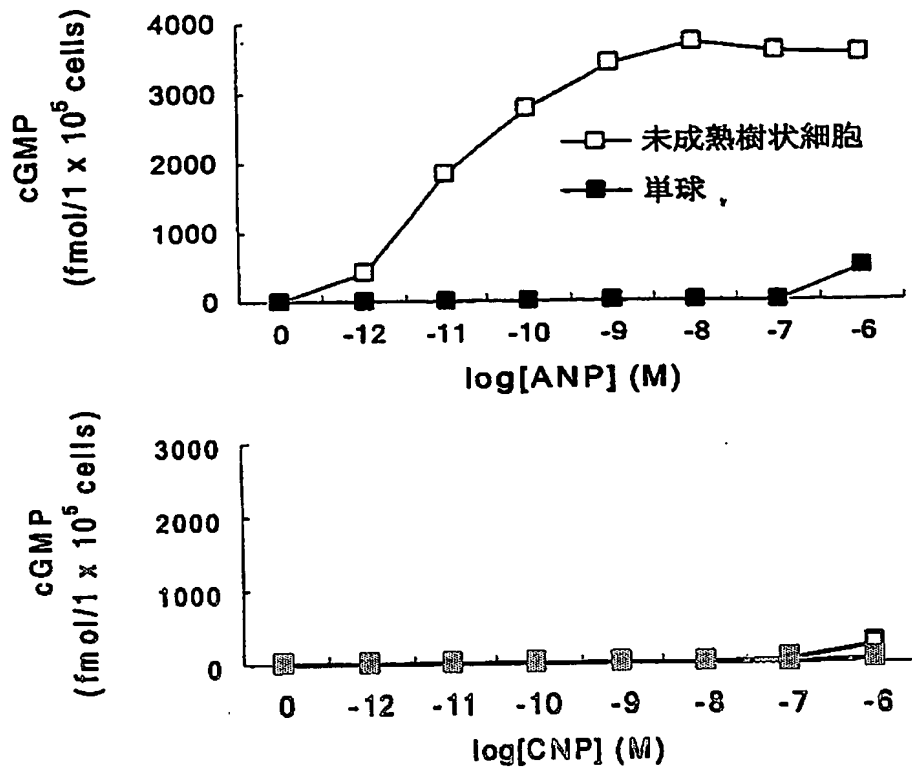


単球

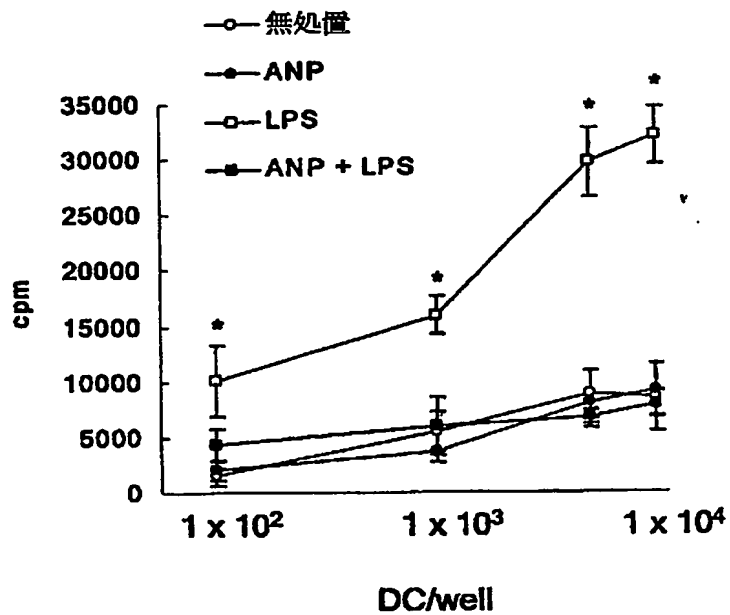
未成熟樹状細胞

胎盤

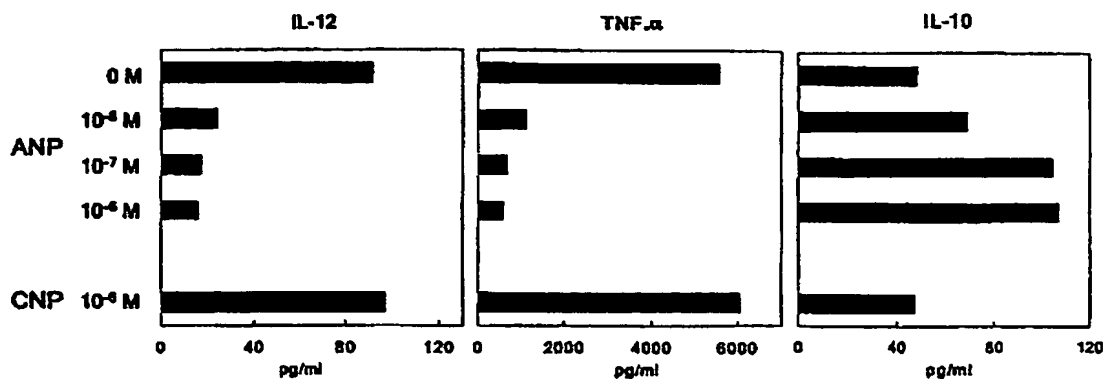
【図 2】



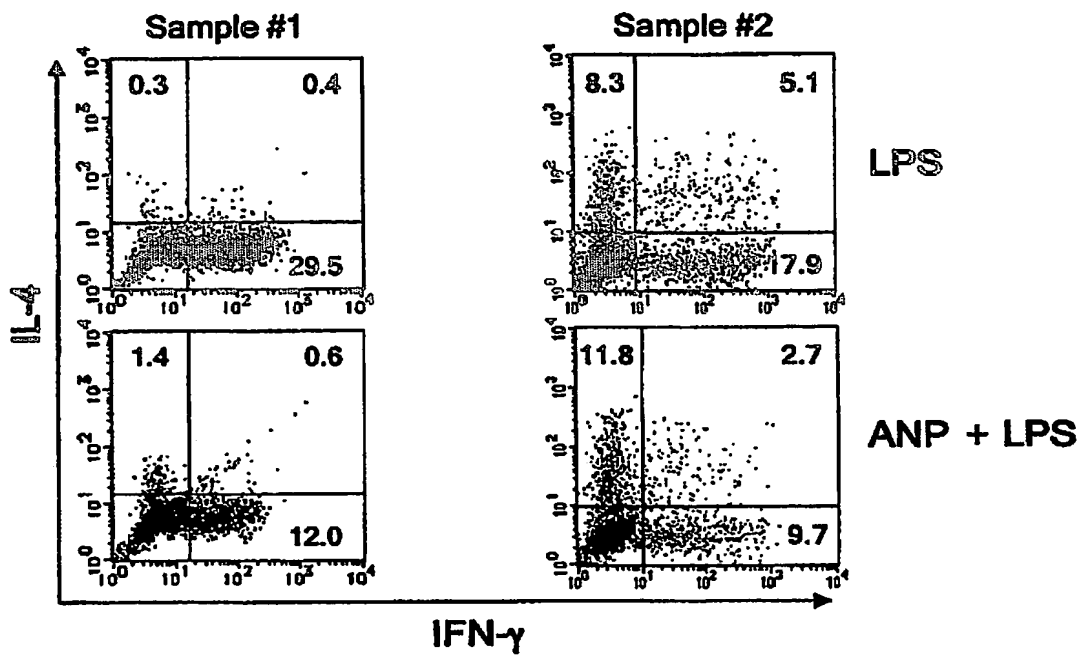
【図 3】



【図4】



【図5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 Th1 型免疫疾患の予防又は治療用医薬組成物の提供。

【解決手段】 樹状細胞に発現する NP 受容体である GC-A に作用して cGMP 産生を亢進し、樹状細胞のサイトカイン産生を調節することにより T 細胞を Th2 型細胞に分化し得る物質を有効成分として含有する Th1 型免疫疾患の予防又は治療に供する医薬組成物を得る。

【選択図】 図 5

特願 2 0 0 3 - 1 6 9 3 7 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [5 0 3 0 6 2 3 1 2]

1. 変更年月日	2 0 0 3 年 2 月 1 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都千代田区麹町五丁目 7 番地 2
氏 名	第一サントリーファーマ株式会社